

## [症例報告]

### MALDI Biotyper での迅速同定が診断に有用であった破傷風の一症例

加藤匡平<sup>1)</sup>・永沢善三<sup>2)</sup>・成田妙子<sup>1)</sup>・船島由美子<sup>2)</sup>

佐藤謙一<sup>2)</sup>・原田哲太<sup>1)</sup>・川嶋裕資<sup>3)</sup>・梅村 創<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup> 医療法人社団高邦会高木病院検査技術部

<sup>2)</sup> 国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科

<sup>3)</sup> 医療法人社団高邦会高木病院外科

(平成 29 年 10 月 23 日受付, 平成 30 年 1 月 15 日受理)

症例は 80 歳代女性, 腹部膨満と下血により当院に救急搬送された。腹部 CT により小腸ガス, 腸液貯留像を認め, イレウスとの診断にて緊急手術が行われ, ダグラス窩にドレーンが留置された。同日, 採取されたドレーン廃液の培養検査が提出され, 遠心分離後の沈渣をアネロウサギ血液寒天/PV 寒天培地を用い, 35°C 嫌気条件下で分離培養した。2 日後, フィルム状に遊走発育した極少量の集落を観察され, グラム染色では *Clostridium* 属が推定されたため, 迅速同定を目的に質量分析計 MALDI Biotyper を使用した結果, *Clostridium tetani* と同定された。そこで, 精査目的として 16S rRNA 遺伝子解析および PCR 法による破傷風毒素産生遺伝子検索を実施した結果, 破傷風毒素産生株の *C. tetani* と確定した。本症例は質量分析計を使用したことで, 極少量の集落から迅速かつ適確に *C. tetani* を同定することができ, 患者の診断・治療に貢献した症例である。

**Key words:** *Clostridium tetani*, Tetanus, Tetanospasmin, MALDI Biotyper

## 序 文

*Clostridium tetani* は動物の腸管や土壤中に広く分布する偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり, 神経毒である Tetanospasmin を産生し, 破傷風を引き起こす<sup>1)2)</sup>。破傷風は罹患すると急激な臨床経過を辿り, 極めて致死率が高いため, 早期の診断と治療を行わなければ呼吸不全や循環動態の悪化により死に至る重症感染症である<sup>3)</sup>。破傷風の診断で *C. tetani* が分離, 同定されることは珍しく, 筋緊張亢進と強直性痙攣などの臨床症状から診断する場合が多い<sup>4)5)</sup>。今回, 我々は絞扼性イレウス患者の術後ドレーン廃液から, 予期せず *C. tetani* を検出した。*C. tetani* は培養に時間を要し, 同定も困難とされているが, 質量分析計 MALDI Bio-

typer (Bruker Daltonics) を使用したことで, 極少量の集落から迅速かつ適確に *C. tetani* を同定することができ, 患者の診断・治療に貢献した症例を経験したので報告する。

## 症 例

患者: 80 歳代, 女性

主訴: 腹痛

既往歴: 子宮筋腫摘出術後, 気管支喘息, 高血圧症, 慢性腎不全

家族歴: 特記事項なし

生活歴: 農業

現病歴: 患者は 20XX 年 9 月嘔気, 嘔吐, 下血の症状にて近医婦人科を受診, 経陰エコーにより卵巣からの炎症性出血と診断された。患者は投薬を受け一時帰宅したが, 同日夜に症状の増悪を認め, 当院救急外来を受診した。

来院時現症: 意識清明, 血圧 120/68 mmHg, 体温 39.2°C, 心拍数 131/min, SpO<sub>2</sub> 93%。救急搬送 2 日前から排便, 排ガスはなく, 来院時には腹部全体に圧

著者連絡先: (〒831-0016) 福岡県大川市大字酒見 141 番地 11

医療法人社団高邦会高木病院検査技術部

加藤匡平

TEL: 0944-88-8283

E-mail: kensa-kenkyu@kouhoukai.org

Table 1. Laboratory findings on admission

Hematology		Hemostasis		Biochemistry			Blood Gas analysis		
WBC	9370 / $\mu$ L	PT (sec)	13.4 sec	ALB	3.7 g/dL	AMY	64 U/L	pH	7.562
NE%	91.7 %	PT (%)	74.6 %	T-Bil	2.6 mg/dL	P-AMY	52 U/L	pCO <sub>2</sub>	27.5 mmHg
LY%	3.9 %	PT (INR)	1.17	AST	35 U/L	UA	8.8 mg/dL	pO <sub>2</sub>	77 mmHg
MO%	4.4 %	APTT	29.9 sec	ALT	16 U/L	BUN	53 mg/dL	ctHb	14.3 g/dL
RBC	438 $\times 10^4$ / $\mu$ L	D-D dimer	3.9 $\mu$ g/mL	ALP	168 U/L	CRE	1.17 mg/dL	Hct	43.8 %
Hgb	14.1 g/dL			LDH	388 U/L	Na	130 mEq/L	cNa <sup>+</sup>	128 mEq/L
Hct	39.1 %			$\gamma$ -GT	18 U/L	K	3.2 mEq/L	cK <sup>+</sup>	3.1 mEq/L
MCV	89.3 fL			CPK	663 U/L	Cl	91 mEq/L	cCl <sup>-</sup>	92 mEq/L
MCH	32.2 pg			CRP	30.79 mg/dL			cCa <sub>2</sub> <sup>+</sup>	2.13 mEq/L
MCHC	36.1 %								
PLT	17.6 $\times 10^4$ / $\mu$ L								

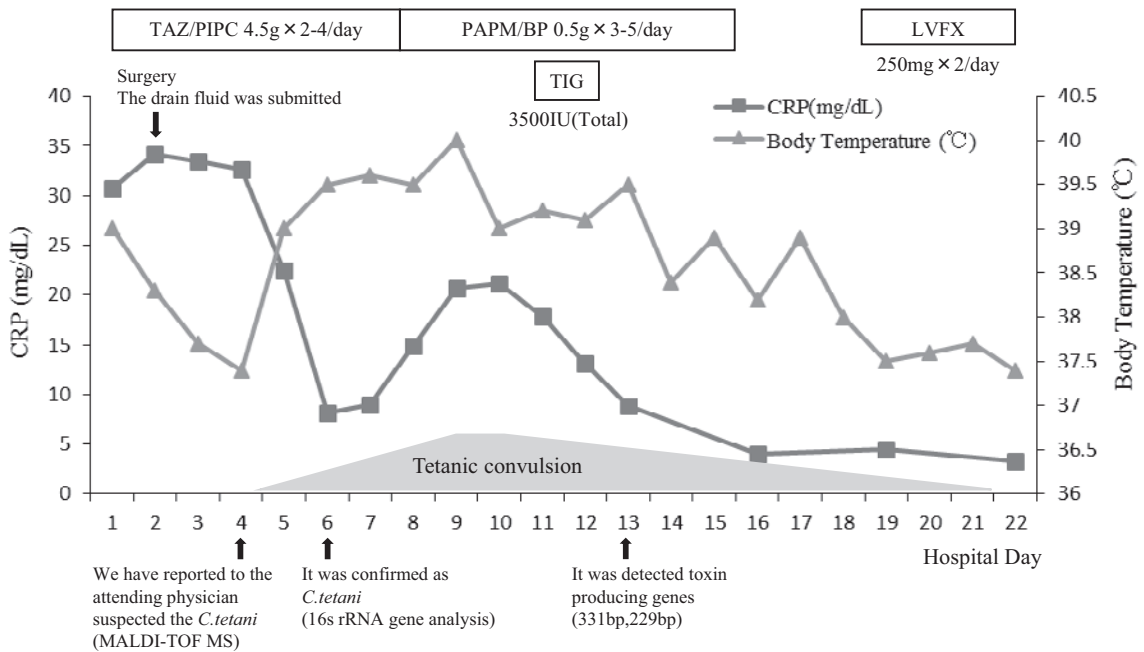


Fig. 1. Clinical course

TIG: Polyethylene glycol treated human anti-tetanus immunoglobulin, TAZ/PIPC: tazobactam/piperacillin, PAM/BP: panipenem/betamipron, LVFX: levofloxacin

痛と膨満感を認めた。

血液・生化学検査所見：Table 1 に入院時検査所見を示した。WBC 9,370/ $\mu$ L, CRP 30.79 mg/dL と炎症反応を認め、LDH 388 U/L, CPK 663 U/L と逸脱酵素の上昇があり、腸閉塞による腸管の細胞壊死によるものと考えられた。

画像所見：入院時の腹部 CT 所見では、広範囲な小腸ガスと腸液貯留像を認めるものの、閉塞起点は不明

瞭であった。

治療経過 (Fig. 1)：患者は既往歴、画像所見、臨床症状によりイレウスが疑われ緊急入院となった。入院翌日の血液検査所見にて WBC 1,210/ $\mu$ L, D.D ダイマー 11.4  $\mu$ g/mL と敗血症と DIC が疑われ緊急手術となり、ダグラス窩にドレーンを留置し、集中治療室管理となった。同日、ドレーン廃液が採取され培養検査が提出された。第 4 病日、MALDI Biotyper を用いて

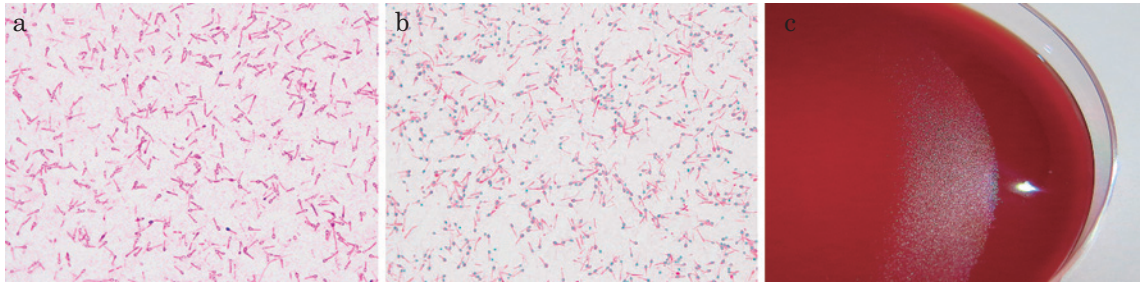


Fig. 2. Cellular morphologies and colony of *C. tetani*

a) Gram stain of *C. tetani*

b) Spore stain of *C. tetani*

c) Colonies of *C. tetani* on the “KBM” Anaerobic Rabbit Blood Agar medium after incubation at 35 °C under an anaerobic condition

同定検査を行い、担当医に *C. tetani* を疑う細菌が検出されたことを報告した。報告時には破傷風感染の徴候は認めず、破傷風トキソイドが筋肉注射された。第5病日、左半身の痙攣を認め、循環動態の悪化など症状の急変により、人工呼吸器管理となった。発熱、開口障害、痙攣など特有の症状の出現、鑑別疾患の否定、*C. tetani* の検出などから、第6病日に破傷風と診断され、抗破傷風免疫グロブリン 3000 単位を静注し、治療が開始された。第7病日、多少の刺激により容易に誘発される全身性硬直性痙攣が出現し、この痙攣は10分以上継続する時も認められ、刺激を抑えるために暗室管理となった。第20病日頃より痙攣は減少し、入院時高値を示したCRP値も継時的に低下した。本症例では痙攣が終息するまでに約3週間を要したが、第26病日、人工呼吸器を離脱し、呼吸訓練、運動療法などのリハビリテーションが実施できるまでに回復し、第75病日に開口障害もなく退院となった。

#### 細菌学的検査

提出されたドレーン廃液は 3,500 rpm、20 分間遠心した後、その沈渣を用いてグラム染色と分離培養を実施した。培養検査には“KBM”BTBII 寒天培地、“KBM”血液寒天培地、“KBM”アネロウサギ血液寒天/PV 寒天培地 (KOHJIN BIO) を用い、増菌培養は極東 HK 半流動性培地 (極東製薬) を使用した。好氣的条件下での 35°C 24 時間培養では“KBM”BTBII 寒天培地および“KBM”血液寒天培地に単独で多数の *Klebsiella pneumoniae* の発育を認めた。嫌氣的条件下での 35°C 48 時間培養では“KBM”アネロウサギ血液寒天/PV 寒天培地に多数の *K. pneumoniae* と少数の *Lactococcus garvieae* および *Clostridium sporogenes* が認め

られ、これらの独立集落と混在して極少量のフィルム状に遊走する集落が観察された。この遊走する極少量の集落に対してグラム染色とウィルツ染色を実施した (Fig. 2a, b)。

菌種の同定には Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry を原理とする Microflex LT の微生物迅速同定システム MALDI Biotyper を使用した。遊走集落をセルスメア法により同定検査を実施した結果、最も類似性の高い菌種として *C. tetani* が Score Value 値 2.108 と種レベルで整合性のある高い同定確率を示した。

菌種確定のために 16S rRNA 遺伝子解析と PCR 法による破傷風毒素産生遺伝子検索の追加検査を試みた。16S rRNA 遺伝子解析では、サイクルシーケンス反応に BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により塩基配列を決定し、得られた DNA 配列を NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性解析を行った。その結果、*C. tetani* の基準株 (*Clostridium tetani* E88 strain Massachusetts) と 99% 一致したことから、ドレーン廃液提出後 4 日目に最終同定菌名を *C. tetani* として主治医に報告した。

PCR 法による破傷風毒素産生遺伝子の検出は加藤らの方法<sup>6)~8)</sup> に準じて実施した。Table 2 に使用したプライマーの塩基配列を示す。PCR 産物を、2% アガロースゲルで電気泳動し、エチレンジウムプロマイドにて染色した。その結果、PCR のターゲットとした破傷風毒素産生遺伝子領域の 331bp および 229bp 付近にバンドが確認された (Fig. 3)。

Table 2. Oligonucleotide PCR primers for the detection of Tetanospasmin

Primers	Synthesized oligonucleotide sequence	Products size (bp)
GAT1 GAT2	5'-gatgatacgtatgccaataacc-3' 5'-taaggcttcacctgtacattg-3'	331
GAT5 GAT6	5'-ctacatggtttatacggaaatgcagg-3' 5'-gatcattgcagctagtgacttgac-3'	229

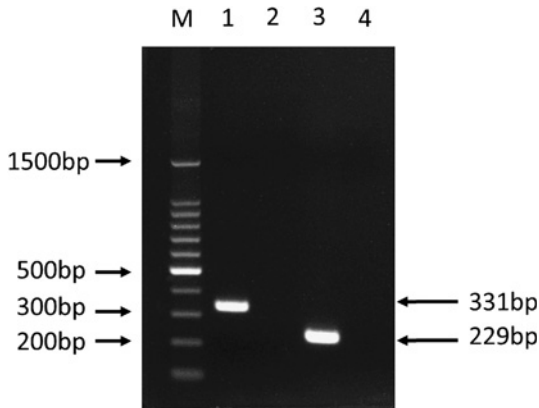


Fig. 3. Results of PCR-based amplification of Tetanospasmin

Lane1: PCR products of bacterial DNA with the primers GAT1 and GAT2

Lane2: No template control with the primers GAT1 and GAT2

Lane3: PCR products of bacterial DNA with the primers GAT5 and GAT6

Lane4: No template control with the primers GAT5 and GAT6

M: molecular weight marker (100 bp ladder)

## 考 察

*C. tetani* は偏性嫌気性芽胞形成グラム陽性桿菌であり、土壌中では主に芽胞の状態が存在し、地理的に偏った分布を示すものの自然界に広く存在している<sup>9)10)</sup>。*C. tetani* の細菌学的特徴としては、寒天培地上でフィルム状に遊走発育する集落を形成すること、グラム染色で端在性に芽胞を有する染色像が観察されることが挙げられる。また、破傷風は少ない菌数で発症すると考えられており、患者検体の顕微鏡学的検査では *C. tetani* を疑う細菌を観察できない場合が多い。本症例も提出されたドレーン廃液のグラム染色では、*C. tetani* に特徴的な染色像は観察されなかった。*Clostridium* 属はグラム陰性桿菌として観察される菌群が存在し<sup>11)</sup>、培養期間や脱色時間等の影響により陰性に染色される場合があるため、グラム染色にて菌種

を推定する場合には注意が必要である。また、遊走する集落を Fig. 2c に示すが、遊走集落形成や遍在する芽胞を有することは *C. tetani* だけが有する特徴ではないため、染色像や集落の性状のみでは *C. tetani* と確定することは困難である。

多くの施設では嫌気性菌の同定検査に生化学的性状の違いを利用した嫌気性菌同定キットが用いられているが、*C. tetani* は生化学的性状所見が乏しいため嫌気性菌同定キットでは同定困難な場合がある<sup>12)</sup>。本症例では MALDI biotyper を使用したことにより、検体提出後 2 日目に *C. tetani* を迅速同定することができた。近年、質量分析計は我が国の大学病院を中心に臨床微生物検査領域で普及し、同定検査における精度および有用性に関する報告も行なわれているが、本症例のように特殊な細菌の同定精度に関する症例報告は少なく、多くの施設では精査のために 16S rRNA 遺伝子解析を追加で実施し、菌種の確定を行なっている。したがって、本症例は他施設においても同じような症例に遭遇し、質量分析計による同定を実施した場合に、*C. tetani* を臨床医に報告する一助となる貴重な報告例と考える。

*C. tetani* の芽胞は創傷部位から組織内に侵入したのち、嫌気環境下で発芽し栄養型菌となり、神経毒である Tetanospasmin を産生する。Tetanospasmin は抑制ニューロンの前シナプスに作用し、神経伝達物質の放出を妨げる<sup>11)13)</sup>。その結果、開口障害や強直性痙攣などの破傷風特有の神経症状を引き起こす。Tetanospasmin を産生する遺伝子は *C. tetani* のプラスミド上に存在しているため、*C. tetani* の存在が破傷風感染と同義ではない<sup>11)13)</sup>。そこで PCR 法により破傷風毒素産生遺伝子検索を実施した。破傷風毒素産生遺伝子領域の 331bp および 229bp 付近にバンドを認めため、Table 2 のプライマーを用いて増幅産物の塩基配列を決定し、NCBI BLAST にて相同性解析を実施した結果、増幅産物は破傷風毒素産生遺伝子であった。これにより本症例から分離された菌種を破傷風毒素産生株の *C. tetani* と確定した。従来、*C. tetani* の最終同定にはマウスを用いた動物実験で毒素産生の有無を

確認する手法が用いられてきたが、加藤らは破傷風毒素産生遺伝子の存在と動物実験による破傷風発症の結果が一致していると報告しているため<sup>6)</sup>、臨床検査室レベルでも破傷風毒素産生遺伝子を確定することで、破傷風の確定診断に貢献できると考える。

破傷風は感染症法で全数把握の5類感染症に位置付けられており、破傷風を診断した医師は7日以内の保健所への届け出が義務付けられている。破傷風患者は開口障害や全身硬直性痙攣などの破傷風特有の臨床症状により診断される場合が多く、国立感染症研究所の報告によると1999～2000年に報告された破傷風157例の中で、臨床材料から菌が分離されたのは1例のみであり<sup>14)</sup>、*C. tetani*の分離に成功している症例は極めて少ない現状にある。また、本症例の検体は絞扼性イレウス患者の術後ドレーン廃液であり、*C. tetani*が分離された検体としては極めて稀である。入院時、目立った外傷はなかったため、何らかの原因で腹腔内に*C. tetani*が侵入し、腸閉塞および組織の壊死により*C. tetani*の増殖しやすい環境が生じたために、破傷風感染に至ったと考える。今回、*C. tetani*を検出した際、開口障害や頸部硬直などの神経症状はなく、担当医は破傷風感染を全く疑っていなかった。そのため*C. tetani*の迅速な同定と報告、破傷風毒素産生遺伝子を検出することで、担当医の迅速な治療に貢献したと考えられる。

最後に*C. tetani*は本症例のように、創部膿瘍のみではなく、様々な膿瘍から検出される可能性があり、膿瘍の同定検査には注意が必要である。また迅速同定において質量分析計は極めて有用性が高く、さらに遺伝子検査を併用することで、詳細な解析が臨床検査室レベルで実施することができ、今後の感染症における早期診断さらには治療にも貢献できると言える。

## 文 献

- 1) Bruggemann, H., S. Baumer, W.F. Fricke, et al. 2003. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 1316-1321.
- 2) Edlich, R.F., L.G. Hill, C.A. Mahler, et al. 2003. Management and prevention of tetanus. J. Long. Term. Eff. Med. Implants. 13: 139-154.
- 3) 伊原史英, 大塚雄一郎. 2014. 明らかな外傷を認めなかった破傷風の2例. 日本耳鼻咽喉科学会会報 117: 41-45.
- 4) 福田 靖, 岩城正昭, 高橋元秀. 2002. 感染症の話 破傷風. 感染症発生動向調査週報. 国立感染症研究所感染症情報センター. [http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k02\\_g1/k02\\_15/k02\\_15.html](http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k02_g1/k02_15/k02_15.html).
- 5) Poudel, P., S. Budhathoki, S. Manandhar. 2009. Tetanus. Kathmandu. Univ. Med. J.(KUMJ) 7: 315-322.
- 6) 加藤直樹, 加藤はる, 渡辺邦友, 他. 1993. PCRによる神経毒素産生性 *Clostridium tetani* と *Clostridium botulinum* の神経毒素遺伝子の同定. 日臨微誌 3: 104-109.
- 7) Eisel, U., W. Jarausch, K. Goretzki, et al. 1986. Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. EMBO. J. 5: 2495-2502.
- 8) Nagao, K., T. Mori, C. Sawada, et al. 2007. Detection of the tetanus toxin gene by polymerase chain reaction: a case study. Jpn. J. Infect. Dis. 60: 149-150.
- 9) 羽根田淳, 塩原康正, 乾 真美, 他. 2011. 相模原周辺における *Clostridium tetani* の分布調査. 感染症学雑誌 80: 690-693.
- 10) Huang, S.W., J.P. Chan, W.Y. Shia, et al. 2013. The utilization of a commercial soil nucleic acid extraction kit and PCR for the detection of *Clostridium tetanus* and *Clostridium chauvoei* on farms after flooding in Taiwan. J. Vet. Med. Sci. 75: 489-495.
- 11) 大門康志, 田中香お里, 渡邊邦友. 2008. 本邦で認知度が低い *Clostridium* の感染症材料からの分離状況と薬剤感受性. 感染症学雑誌 82: 205-212.
- 12) 小貫智世, 二本柳伸, 中村正樹, 他. 2013. 全身性破傷風患者の創傷部から分離した *Clostridium tetani* の1症例. 感染症学雑誌 87: 33-38.
- 13) Cook, T.M., R.T. Protheroe, J.M. Handel. 2001. Tetanus: a review of the literature. Br. J. Anaesth. 87: 477-487.
- 14) 福田 靖, 岩城正昭, 高橋元秀. 破傷風とは. 国立感染症研究所. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansen/nnohanashi/466-tetanus-info.html> 2017年12月1日現在.

## Rapid identification of *Clostridium tetani* from drain fluid of a patient with strangulated ileus, using mass spectrophotometry and DNA sequencing

Kyohei Kato<sup>1)</sup>, Zenzo Nagasawa<sup>2)</sup>, Taeko Narita<sup>1)</sup>, Yumiko Funashima<sup>2)</sup>, Kenichi Sato<sup>2)</sup>,  
Tetsuhiro Harada<sup>1)</sup>, Yusuke Kawashima<sup>3)</sup>, Tsukuru Umemura<sup>1) 2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Medical Kouhoukai Takagi Hospital

<sup>2)</sup>Department of Medical Technology and Sciences,

International University of Health and Welfare, Fukuoka, Japan

<sup>3)</sup>Department of Surgery, Medical Kouhoukai Takagi Hospital

An 80s woman who had abdominal distention and melena, was emergently referred to an academic medical center for the treatment of deteriorated symptoms. Computed tomography showed intestinal gas and intestinal fluid retention. Emergency operation was performed as ileus. Postoperative drain fluid was examined for bacterial culture. The fluid was anaerobically cultured in “KBM” Anaerobic Rabbit Blood Agar medium. A tiny amount of film-like colony appeared on day 2 of culture. Gram staining and spore staining of colonies revealed distinctive drumstick appearance. MALDI-TOF MS identified *Clostridium tetani* as the causative microorganism. The diagnosis of Tetanus was confirmed by 16S rRNA gene analysis and toxin-producing gene detected by PCR. In conclusion, MALDI-TOF MS and gene sequence analysis are new relevant technologies to make rapid, accurate diagnosis of Tetanus.